

**DER EINFLUSS VON ACETALDEHYD
AUF EINIGE CHEMISCHE UND BIOLOGISCHE
EIGENSCHAFTEN DES COENZYMS A**

von

Volker F. Lachmann

aus

Hayнау/Schlesien

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. F. Heim

**DER EINFLUSS VON ACETALDEHYD
AUF EINIGE CHEMISCHE UND BIOLOGISCHE
EIGENSCHAFTEN DES COENZYMS A**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Volker F. Lachmann
aus
Haynau/Schlesien

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der
Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Professor Dr. G. Koch
Referent: Priv. Doz. Dr. med. H.P.T. Ammon
Korreferent: Professor Dr. F. Heim
Tag der mündlichen Prüfung: 22. Februar 1972

DER EINFLUSS VON ACETALDEHYD
AUF EINIGE CHEMISCHE UND BIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN
DES COENZYMS A

Untersuchungen an Gehirn und Leber der Maus haben gezeigt, dass die Acetat-übertragende Eigenschaft von Coenzym A (CoA) nach i.v. Zufuhr von Alkohol abnimmt (1 - 4). Bei in vitro Versuchen mit Homogenaten beider Organe ergab sich, dass Alkohol nur im Leberhomogenat, nicht aber in dem von Gehirn die biologische Aktivität des CoA herabsetzt (5). Da von beiden Organen nur die Leber in der Lage ist, Alkohol zu dehydrieren, wurde geschlossen, dass nicht der Alkohol selbst, sondern sein Abbau im Zusammenhang mit der Abnahme der transacetylierenden Eigenschaften des CoA stehen müsse.

Das erste Zwischenprodukt beim Alkoholabbau ist der Acetaldehyd. Ueber den Einfluss von Acetaldehyd auf die biologische Aktivität des CoA liegen mehrere Untersuchungen vor, die sowohl in vivo als auch in vitro angestellt wurden. Nach i.v. Injektion von Acetaldehyd wurde eine Verminderung an Acetat-übertragendem CoA in der Leber der Maus beobachtet (4). Zusatz von Acetaldehyd zu Mitochondrien von Gehirn und Leber derselben Spezies führte ebenfalls zur Abnahme der transacetylierenden Eigenschaften des CoA (6). Einen indirekten Hinweis auf den Acetaldehyd als dem eigentlich verantwortlichen Produkt des Alkoholabbaus für die biologische Inaktivierung des CoA ergaben Untersuchungen mit Hemmstoffen des Alkohol- und Acetaldehyd-Abbaus. So unterbleibt in vivo bei der Maus die Abnahme der CoA-Aktivität im Gehirn, wenn man den Alkoholabbau durch Pyrazol hemmt (7). Blockiert man dagegen die Dehydrierung des Acetaldehyds mit Disulfiram, so verstärkt sich die Hemmwirkung des Alkohols auf die biologische Akti-

vität des CoA in der Leber (5).

Acetaldehyd ist eine sehr reaktionsfähige Verbindung, die mit einer grossen Anzahl chemischer Gruppierungen, wie z.B. -OH- und -SH-Gruppen Bindungen eingehen kann. CoA enthält, wie die Abb. 1 zeigt, sowohl OH-Gruppen an seinem Ribose- und Pantothensäureanteil als auch eine SH-Gruppe am Cysteamin, deren Unversehrtheit die Voraussetzung für die Uebertragung von Acylgruppen ist. Man bezeichnet sie als die funktionelle Gruppe des CoA.

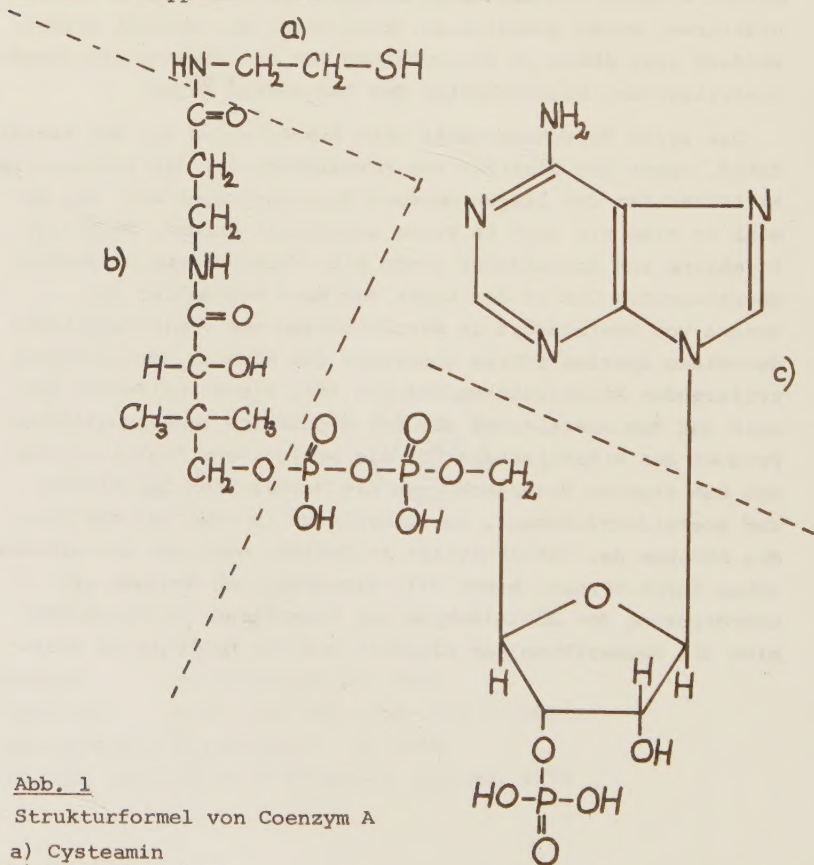


Abb. 1

Strukturformel von Coenzym A

- a) Cysteamin
- b) Pantothensäure
- a) + b) Pantethein
- c) Adenin

Zur Frage, ob die Blockierung der transacetylierenden Eigenschaften des CoA in vivo und in vitro durch Acetaldehyd auf eine chemische Veränderung des CoA Moleküls zurückzuführen sein könnte, wurden Untersuchungen mit handelsüblichem CoA-SH und Acetaldehyd angestellt. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass Acetaldehyd mit der funktionellen -SH-Gruppe des CoA reagiert, vermutlich unter Bildung eines Semimercaptals oder Mercaptals. Dabei geht die transacetylierende Eigenschaft des CoA verloren.

Methodik

Für alle Versuche verwendeten wir Coenzym A-SH der Firma Boehringer Söhne, Mannheim, und Acetaldehyd purissimum der Firma Merck, Darmstadt, der vor jeder Verwendung frisch destilliert wurde.

I. Einfluss verschiedener Konzentrationen von Acetaldehyd auf die Acetat-übertragenden Eigenschaften des CoA und die Nachweisbarkeit von dessen -SH-Gruppen:

CoA-SH wurde als Lösung von 0,2 $\mu\text{M}/\text{ml}$ in 7 mM Sörensen Puffer pH 7,4 verwendet. Diese Coenzym A-Konzentration entspricht etwa der in vivo in der Leber mit dem Test von Tabor und Mitarbeitern (8) nachweisbaren CoA-Menge. Die Acetaldehydkonzentration betrug 0-2-20-40-80-120 und 200 $\mu\text{M}/\text{ml}$. 1 ml der CoA-SH-Lösung wurde in einem 1 ml Gefäss vor der Zugabe von Acetaldehyd im Eisbad auf 0° C gebracht. Nach Zusatz von Acetaldehyd wurden die Reaktionsgefässe so luftdicht verschlossen, dass sich zwischen Flüssigkeit und Verschluss kein Gasraum befand. Das Ganze wurde dann 30 Min. bei 37° C im Wasserbad gehalten. Abschliessend wurde im Eisbad auf 0° C abgekühlt und das Gefäss geöffnet. Ein Teil der Lösung wurde für die Bestimmung der SH-Gruppen nach Grunert und Phillip (9) verwendet, der Rest zur Entfernung von flüchtigem Acetaldehyd aufgekocht. In ihm wurde nach dem von Tabor und Mitarbeitern (8) modifizierten Test nach Kaplan und Lipman (10) die Fähigkeit des CoA, Acetat auf p-Nitro-

anilin zu übertragen, geprüft.

II. Herstellung und Isolierung des Reaktionsproduktes zwischen CoA-SH und Acetaldehyd:

Um die biologischen und chemischen Eigenschaften der nach Zusatz von Acetaldehyd entstandenen Verbindung in Abwesenheit nicht umgesetzter Reaktionspartner untersuchen zu können, musste diese nach der Reaktion chromatographisch abgetrennt und isoliert werden:

a) Herstellung der Verbindung:

0,06 ml einer frisch hergestellten, eisgekühlten, wässrigen Coenzym-A-SH-Lösung mit 1600 μg CoA-SH/ml (= 2,08 $\mu\text{mol/ml}$) wurden in 0,12 ml-Reagenzgläsern mit eingeschliffenem Stopfen mit 0,06 ml (= 1,08 $\mu\text{mol/ml}$) eiskaltem, frischdestilliertem Acetaldehyd versetzt. Die Reagenzgläser wurden luftdicht verschlossen und während 30 Min. in einem Wasserbad von 37° C gehalten.

b) Isolierung der Verbindung

Das nach dem unter a) beschriebenen Verfahren erhaltene Gemisch wurde mit 0,1 ml Chromatographiepipetten so auf das Chromatographiepapier aufgetragen, dass jeweils der Inhalt eines Reagenzgläschens einen Fleck mit etwa 100 μg ergab. Mit einem Gebläse wurde dauernd durch Kaltluft das überschüssige Wasser und der Acetaldehyd entfernt. Die Chromatogramme, auf denen maximal 3 Flecke nebeneinander aufgetragen waren, wurden anschliessend in Chromatographiebehälter gebracht.

Nach zahlreichen Versuchen mit absteigender und aufsteigender Papierchromatographie und verschiedenen Fließmittelgemischen (Aethanol/H₂O; Pyridin/Isopropanol/H₂O; Aethanol/Acetatpuffer pH 4,5; jeweils in verschiedenen Mengenverhältnissen), wurde die absteigende Methode mit Aethanol/Aqua dest. 1 : 1 als die am besten geeignete angewendet. Nach ca. 15 Std. wurden die Chromatogramme herausgenommen und an der Luft zum Trocknen aufgehängt.

Da der Adeninanteil des CoA-Moleküls im UV-Bereich eine starke Absorption aufweist, konnten die Flecke nach dem Trocknen durch Bestrahlen mit einer UV-Lampe und durch Unterlegen von Photokopierpapier auf letzterem sichtbar gemacht werden. (Belichtungszeit: 15 - 20 sec.). Der Rf-Wert betrug 0,72, sowohl für reines CoA-SH (Kontrolle), als auch für das Reaktionsprodukt zwischen CoA-SH und Acetaldehyd.

Nach Durchzeichnen der Fleckenränder wurden die Papierflecke ausgeschnitten. War eine Aufbewahrung notwendig, so wurden sie in einem fest verschlossenen Glasgefäß in eine Kühltruhe mit -16°C gebracht. Die so gewonnenen Papierflecke enthielten ca. 95% der aufgetragenen Substanzmenge und konnten nun direkt oder nach Eluieren der Substanz mit Aqua dest. zu weiteren Untersuchungen verwendet werden.

III. Biologische und chemische Eigenschaften des Reaktionsproduktes zwischen CoA und Acetaldehyd

Nach dem unter II a) und b) beschriebenen Verfahren wurden mehrere Chromatographieflecke aus reinen bzw. mit Acetaldehyd vorbehandelten CoA-SH-Lösungen gewonnen und mit Aqua dest. eluiert.

a) Quantitative Bestimmung der Acetat-übertragenden Eigenschaft von CoA-SH

Zur Bestimmung der Fähigkeit des CoA, Acetat zu übertragen, wurde die Methode von Tabor und Mitarbeitern (8) in Anwendung gebracht. Die Abnahme der biologischen Aktivität der rein isolierten Verbindung zeigt gleichzeitig eine entsprechende Zunahme des neuen Produkts an.

b) Quantitative Bestimmung des Adeninanteils des CoA

Um einen exakten quantitativen Vergleich zwischen biologisch aktivem und biologisch inaktivem CoA anstellen zu können, war eine weitere Bestimmungsmethode notwendig, und zwar wurde nach einem Vorschlag von Decker (15), die

Messung der Absorption des Adeninanteils im CoA (UV, Messstrahlung 260 m μ) herangezogen. Sie ergibt die Gesamtmenge der im Testansatz vorliegenden CoA-Menge, unabhängig von ihrer biologischen Aktivität. Mehrere Verdünnungsreihen reiner CoA-SH-Lösungen von 10 μ g/ml bis 80 μ g/ml (= 0,013 - 0,104 μ mol/ml) konnten mit Hilfe dieser Methode mit einer Abweichung von max. $\pm$ 5% bestimmt werden. In diesem Bereich wurden auch die Messungen mit unseren Proben durchgeführt.

c) Qualitativer Nachweis von -SH- und -SS- sowie Acyl-Gruppen

Nach dem unter II a) und b) beschriebenen Verfahren wurden wiederum mehrere Papierflecke gewonnen, wobei auch CoA-SH-Lösungen ohne Vorbehandlung aufgetragen worden waren. Ein und derselbe Fleck wurde nun nacheinander mit den Reagenzien I, II und III (s.u.), (9), auf -SH-, -SS- und Acylgruppen geprüft.

-SH-Gruppen:

Reagenz I: 1,5 g Nitroprussid-Natrium gelöst in 5 ml 2n H₂SO₄ + 95 ml Methanol + 10 ml Ammoniak 25%, filtriert und in der Kälte aufbewahrt. Das Reagenz zeigt beim Aufsprühen im Laufe von Sekunden freie -SH-Gruppen durch eine Rotfärbung an.

-SS-Gruppen:

Reagenz II: 2 g KCN gelöst in 5 ml Aqua dest. + 95 ml Methanol. Das Reagenz dient zum Nachweis von durch -CN-spaltbaren Schwefelverbindungen, zu denen Disulfidgruppen gehören, und ergibt im Anschluss an Reagenz I eine Rotfärbung. Die Rotfärbung von bereits vorhandenen SH-Gruppen wird verstärkt.

Acyl-Gruppen:

Reagenz III: 3 g NaOH gelöst in 10 ml Aqua dest. + 50 ml Methanol. Es wird verwendet zur Abspaltung der Acylgruppe von Acylmerkaptanen. Bei einer positiven Reaktion entsteht im Anschluss an die Verwendung von Reagenz I auch

hier eine Rotfärbung.

Alle Reagenzien zeigen eine hohe Empfindlichkeit; selbst bei Konzentrationen von $0,01 \mu\text{mol/ml}$ CoA wurden Farbreaktionen in Kontrollversuchen gefunden.

d) Infrarotspektroskopische Untersuchung des Reaktionsproduktes

Verwendung fand reines CoA-SH (Kontrolle) sowie mit Acetaldehyd umgesetztes CoA-SH, das wie unter II a) und b) beschrieben, gewonnen wurde. Nach dem Eluieren mit einer möglichst geringen Menge Aqua dest. (ca. 1 ml), wurde das Wasser durch fünfstündiges Trocknen der Substanz über $\text{CaCl}_2/\text{P}_2\text{O}_5$ an der Oelpumpe und 30-minütiges Behandeln mit kaltem Föhn entfernt. Dabei durfte die Substanz über P_2O_5 nicht zu trocken werden, um einen innermolekularen Wasserentzug zu vermeiden. Man erhielt so eine wasserklare, etwas schmierig-klebrige Substanz, die anschliessend zwischen zwei KBr-Platten mit dem BECKMANN-Spektrophotometer IR-12 untersucht wurde. (Wellenlängenbereich $3000 - 400 \text{ cm}^{-1}$).

e) Stabilität des Reaktionsproduktes bei verschiedenem pH

Da für diese Untersuchung grössere Mengen des Reaktionsproduktes zwischen CoA-SH und Acetaldehyd benötigt wurden, musste zunächst die nach II a) und b) hergestellte Verbindung angereichert werden. Dazu wurden für jede Messreihe 18 bis 20 Papierstücke nach der Chromatographie so aneinander genäht, dass sie wie bei einer Kolonne mit Aqua dest. eluiert werden konnten. Die Gesamtmenge des Reaktionsproduktes wurde nach der unter III b) angegebenen Methode gemessen, indem nach ca. 12-maligem Eluieren eine Probe so verdünnt wurde, bis sich der Gehalt an CoA so weit vermindert hatte, dass er in den Messbereich der Eichkurve ($10 \mu\text{g}$ bis $80 \mu\text{g}$ CoA/ml) fiel. Dem Eluat von insgesamt ca. 4,5 ml wurden nun 7 - 8 Proben mit je 0,5 ml entnommen. In Zentrifugengläser gebracht, wurden sie mit $n/10$ NaOH bzw. $n/10$ HCL auf pH-Werte zwischen

pH 4 - 11 eingestellt. Die verschlossenen Glasröhrchen blieben dann 30 Min. bei 25° C stehen. Die pH-Werte wurden anschliessend nochmals kontrolliert, da sich durch Pufferwirkung des Coenzym die Werte immer etwas verschoben. Danach wurde aus jedem Gläschen 0,1 ml entnommen und darin die biologische Aktivität des CoA bestimmt.

Versuchsergebnisse und Diskussion

I. Dosiswirkungsbeziehungen zwischen Acetaldehydkonzentration und Blockierung der Uebertragung von Acetat auf p-Nitroanilin sowie der -SH-Gruppen des CoA.

Bei früheren Versuchen in vitro wurde eine Dosiswirkungsbeziehung zwischen Acetaldehydkonzentration und Abnahme der transacetylierenden Eigenschaften des CoA in Homogenaten von Gehirn und Leber beobachtet (6). Dabei ergab sich, dass bei Leberhomogenaten (Ausgangskonzentration von CoA 0,024 $\mu\text{M}/\text{ml}$) bereits 2 $\mu\text{M}/\text{ml}$ Acetaldehyd die CoA-Aktivität um ca. 40% verminderte; bei 32 $\mu\text{M}/\text{ml}$ war sie völlig gehemmt. Bei Hirnhomogenaten (Ausgangskonzentration von CoA 0,014 $\mu\text{M}/\text{ml}$) hemmten bereits 0,125 $\mu\text{M}/\text{ml}$ Acetaldehyd die CoA-Aktivität um etwa 35%. Bei 1,6 $\mu\text{M}/\text{ml}$ war sie vollständig blockiert.

Wie die Abb. 2 zeigt, kommt es im rein chemischen Versuch nach Zusatz von Acetaldehyd bei einer Konzentration von 2 $\mu\text{M}/\text{ml}$ bereits zu einer deutlichen Hemmung der Acetat-übertragenden Eigenschaft des CoA, die mit zunehmender Acetaldehydkonzentration weiter fortschreitet. Bei 120 $\mu\text{M}/\text{ml}$ Acetaldehyd ist die Acetatübertragung auf p-Nitroanilin praktisch völlig blockiert. Verglichen mit den bei biologischem Material verwendeten Konzentrationen an Acetaldehyd, sind jedoch im chemischen Versuch grössere Mengen an Acetaldehyd notwendig, um eine ähnlich starke Hemmung der CoA-Aktivität zu erzielen. Die Ursache für diesen Unterschied könnte erstens darin liegen, dass auch die Konzentration von CoA unter unseren Be-

dingungen im chemischen Versuch um mehr als eine Zehnerpotenz höher lag als das bei den Versuchen mit Homogenaten der Fall war. Zweitens ist an eine Beteiligung von Enzymen an der Bildung des Reaktionsproduktes zwischen Acetaldehyd und CoA-SH in vitro zu denken, die beim chemischen Versuch nicht vorhanden war.

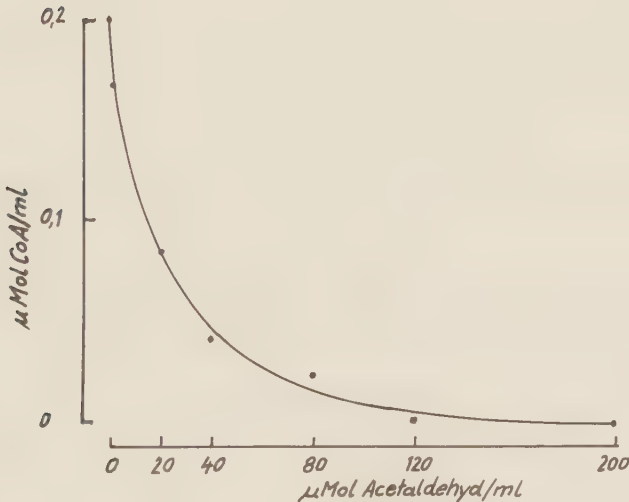


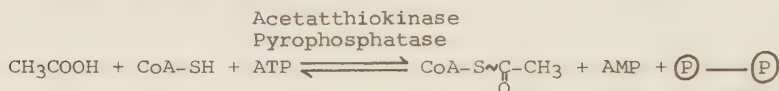
Abb. 2

Einfluss von verschiedenen Acetaldehydkonzentrationen auf die Menge an Acetat-übertragendem CoA. (Ausgangsmenge an biologisch aktivem CoA: 0,2 $\mu\text{M/ml}$)

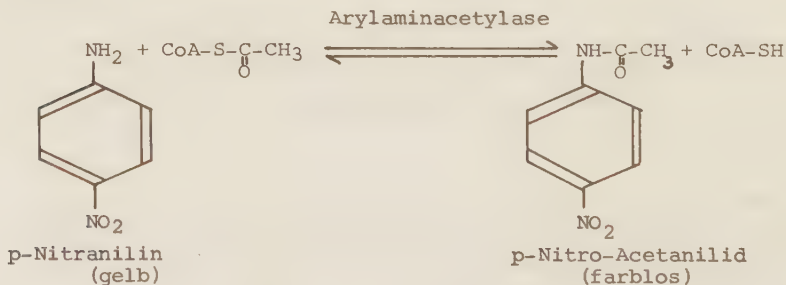
Der Hemmung der Transacetylierung dürfte ein Eingriff des Acetaldehyds am CoA-Molekül zugrunde liegen, der diesem die Fähigkeit entzieht, Acetat zu übertragen. Eine Beeinflussung des Acetylierungstestsystems als solchem durch Acetaldehyd ist dagegen weniger wahrscheinlich, da wir freien Acetaldehyd

vor dem Einsatz des behandelten CoA in den Test durch Aufkochen entfernt haben und, wie später gezeigt wird, auch das chromatographisch gereinigte Reaktionsprodukt zwischen Acetaldehyd und CoA-SH keine nennenswerten transacetylierenden Eigenschaften mehr besitzt.

Die Fähigkeit des CoA, Acylgruppen zu übertragen, hängt von der Unversehrtheit seiner freien -SH-Gruppe ab (Abb. 1). Die Acetatübertragung auf p-Nitroanilin in dem von Tabor und Mitarb. (8) modifizierten Test nach Kaplan und Lipman (10) erfolgt nach der Gleichung:



Es wird eine dem CoA-SH-Gehalt entsprechende Menge an "aktivierter Essigsäure" gebildet, die in einer weiteren Reaktion nach



die gelbe Nitroverbindung acetyliert und dabei entfärbt, was, photometrisch gemessen, eine quantitative Aussage über den biologisch aktiven CoA-Gehalt der Lösung erlaubt.

Durch eine Reaktion des Acetaldehyds mit der -SH-Gruppe des CoA würde diese blockiert und somit dem biologischen Nachweis entzogen. Unser nächster Schritt konzentrierte sich daher auf die Frage, ob nach Zusatz von Acetaldehyd die Nach-

weisbarkeit freier -SH-Gruppen am CoA-SH verloren geht.

Wie die Abb. 3 zeigt, führt Acetaldehyd in gleichem Umfange zur Abnahme der freien -SH-Gruppen wie zur Hemmung der Acetatübertragung. Bereits $2 \mu\text{M}/\text{ml}$ vermindern die Konzentration der SH-Gruppen deutlich, und zwischen 80 und 120 $\mu\text{M}/\text{ml}$ ist fast kein freies -SH mehr nachzuweisen.

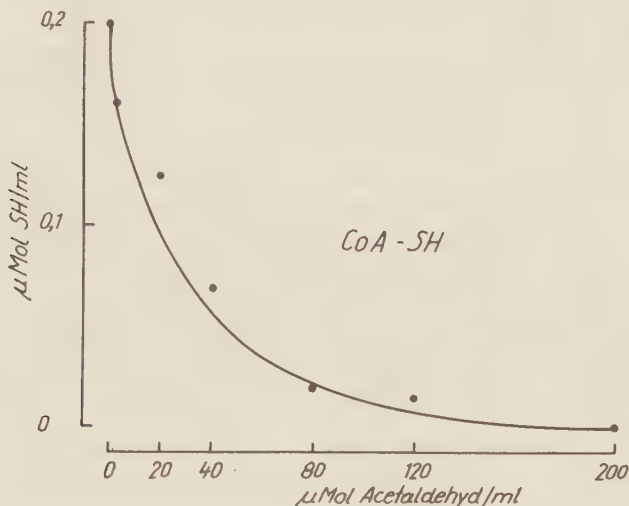


Abb. 3

Einfluss von verschiedenen Acetaldehydkonzentrationen auf die Nachweisbarkeit von SH-Gruppen am CoA. (Ausgangsmenge an CoA-SH: $0,2 \mu\text{M}/\text{ml}$)

Es ist daher anzunehmen, dass der Verlust der transacetylierenden Eigenschaften des CoA nach dem Zusatz von Acetaldehyd mit dem Verlust der freien SH-Gruppen des CoA im Zusammenhang steht.

Um die durch Acetaldehyd hervorgerufenen Änderungen am CoA-SH-Molekül einer detaillierten Analyse unterziehen zu

können, stellten wir uns das Reaktionsprodukt aus CoA-SH und Acetaldehyd in grösseren Mengen dar und reinigten es von nicht umgesetzten Bestandteilen durch Papierchromatographie. Zunächst wurde zur Kontrolle verglichen, in wie weit die mit dem optischen Test nachweisbare Menge an CoA mit der im biologischen Test messbaren CoA-Menge bei unbehandeltem und mit Acetaldehyd behandeltem CoA-SH nach Papierchromatographie übereinstimmt.

	COENZYM A		
	eingesetzte Menge nM/ml	im optischen Test gemessen nM/ml	im biolog. Test gemessen nM/ml
CoA-SH unbehandelt	$59,78 \pm 3,58$ (n = 8)	$56,4 \pm 2,82$ (n = 8)	$53,8 \pm 0,24$ (n = 8)
CoA-SH mit Acetalde- hyd behandelt	$59,78 \pm 3,58$ (n = 8)	$56,4 \pm 2,82$ (n = 8)	$9,94 \pm 0,06$ (n = 8)

Tabelle 1

Vergleich zwischen optisch und biologisch messbarem CoA-SH ohne und nach Vorbehandlung mit Acetaldehyd (s. Methode II a) und b) sowie III a) und b)

Mittelwerte $\pm$ SEM; n = Anzahl der Versuche

Wie die Tabelle 1 zeigt, stimmen beim unbehandelten CoA-SH die in die beiden Tests eingesetzten Mengen gut mit den gefundenen überein. Es besteht also kein Unterschied zwischen dem im optischen Test und dem im biologischen Test nachgewiesenen CoA. Anders ist dies bei mit Acetaldehyd vorbehandeltem CoA. Während die eingesetzte Menge zwar mit der im optischen Test

nachweisbaren Menge an CoA übereinstimmt, finden sich im biologischen Test nur noch etwa 18% des eingesetzten CoA. Dieser, zu den Ergebnissen der Abb. 2 analoge Befund, zeigt, dass das CoA-SH zwar noch durch seine Adeninkomponente im gleichen Umfange nachweisbar ist wie vor der Behandlung mit Acetaldehyd, dass es aber seine biologische Eigenschaft, nämlich Acetat zu übertragen, verloren hat.

Der Verlust von freien SH-Gruppen kann theoretisch durch folgende chemische Veränderungen erfolgt sein:

1. Disulfidbildung
2. Acylierung
3. Oxydation zu einer SO₂-Gruppe
4. Verbindung mit Acetaldehyd

Die 1. und 2. Möglichkeit prüften wir qualitativ unter Verwendung empfindlicher Reagenzien zum Nachweis von -SH-, -SS- und Acyl-Gruppen (s. Methodik). Wir verglichen dabei immer unbehandeltes und mit Acetaldehyd behandeltes CoA-SH. Die Ergebnisse dieser qualitativen Prüfung zeigt die Tabelle 2

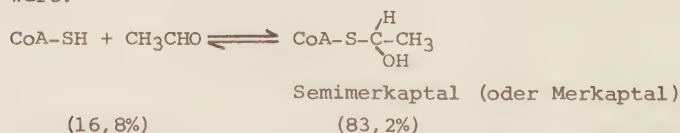
<u>Prüfung auf:</u>	COENZYM A-SH	
	unbehandelt	mit Acetaldehyd behandelt
-SH (Reagenz I)	+	-
-SS- (Reagenz I + II)	++	-
Acyl (Reagenz I + III)	++	-

Tabelle 2

Farbreaktion von CoA-SH ohne und nach Behandlung mit Acetaldehyd nach Zusatz von Reagenzien auf -SH-, -S-S- und Acyl-Gruppen.

Bei Versetzen von CoA-SH mit Reagenz I erhielt man, wie erwartet, sofort eine Rotfärbung, die sich bei Behandlung mit Reagenz II wesentlich vertiefte und nach Zugabe von III keine weitere Änderung mehr zeigte. Da bereits Reagenz I eine Rotfärbung zeigt, kann trotz Intensivierung der Farbe mit Reagenz II nicht auf die Anwesenheit von S-S-Gruppen geschlossen werden. Dies ist für unsere Fragestellung auch unerheblich. Das mit Acetaldehyd vorbehandelte CoA zeigte dagegen keine unmittelbare Farbreaktion auf die nacheinander zugegebenen Reagenzien I bis III. Es fand sich lediglich nach ca. einer Woche eine geringe Rötung der behandelten Flecke.

Die Ergebnisse der Tabelle 2 lassen vermuten, dass durch die Behandlung mit Acetaldehyd die -SH-Gruppe weder zu einer Disulfidgruppe oxydiert, noch in eine Acylverbindung überführt worden war. Letztere Möglichkeit war von vornherein unwahrscheinlich, da Acylderivate des CoA im biologischen Test erfasst werden. Die geringe Rotfärbung nach längerer Zeit lässt jedoch darauf schliessen, dass sich die neue Verbindung selbst bis zu einem gewissen Prozentsatz aufspaltet und sich, wie Tabelle 2 zeigt, im wässrigen Milieu ein Gleichgewicht zwischen CoA-SH und umgesetztem-SH einstellt, das nach obigen Resultaten folgendermassen zu formulieren wäre:

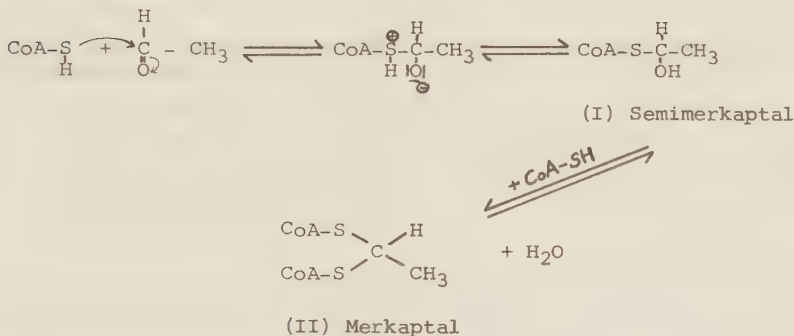


Auf dem Chromatographiepapier tritt diese Reaktion mit Aufnahme von Luftfeuchtigkeit verzögert auf.

Die 3. Möglichkeit, die Ueberführung der -SH- in eine SO_2 -Gruppe ist sehr unwahrscheinlich, da es sich beim Acetaldehyd nicht um ein Oxydationsmittel handelt, das in der Lage wäre, diese Reaktion durchzuführen.

Die 4. Möglichkeit, in wie weit Acetaldehyd mit der -SH-Gruppe des CoA reagiert, wurde mit einem Infrarotspektrogramm von CoA-SH und dessen Reaktionsprodukt mit Acetaldehyd zu klären versucht.

Bei der chemischen Reaktion zwischen CoA-SH und Acetaldehyd sind folgende Umsetzungen an der SH-Gruppe zu erwarten:



Die Umsetzung nach (I) und (II) entspricht dabei der Bildung der Halbacetale bzw. Acetale aus Aldehyden und Alkoholen, jedoch verläuft sie infolge der grösseren Nukleophilie der SH-Gruppe wesentlich leichter, weshalb auch die Hydrolyse eines Merkaptals nur schwer gelingt. Während über Darstellungen und Eigenschaften der Merkaptale in der Literatur reichlich Material vorhanden ist, wurden genaue Untersuchungen über Semimerkaptale fast überhaupt nicht gefunden (13, 14). Die Ursache dafür ist in der Unbeständigkeit der Verbindung zu finden; im allgemeinen bleibt die obengenannte Reaktion nicht auf der Stufe eines Semimerkaptals stehen, sondern bildet mit einer zweiten SH-Gruppe unter Wasserabtritt das Merkaptal (II).

Die Ergebnisse der Infrarotspektroskopie zeigen die Abbildungen 4 und 5.

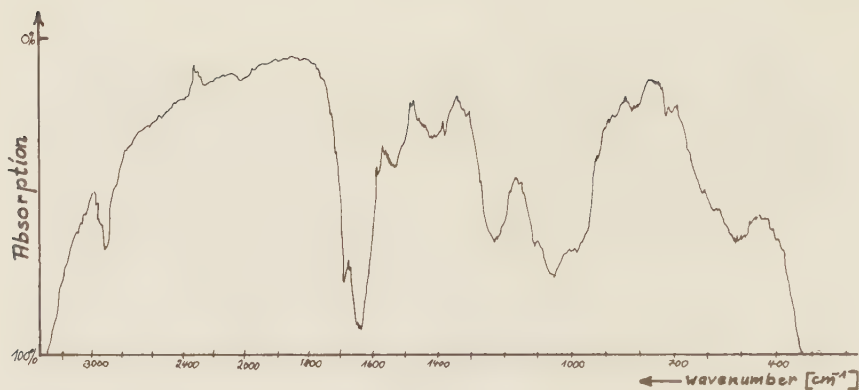


Abb. 4

Infrarotspektrum von CoA-SH

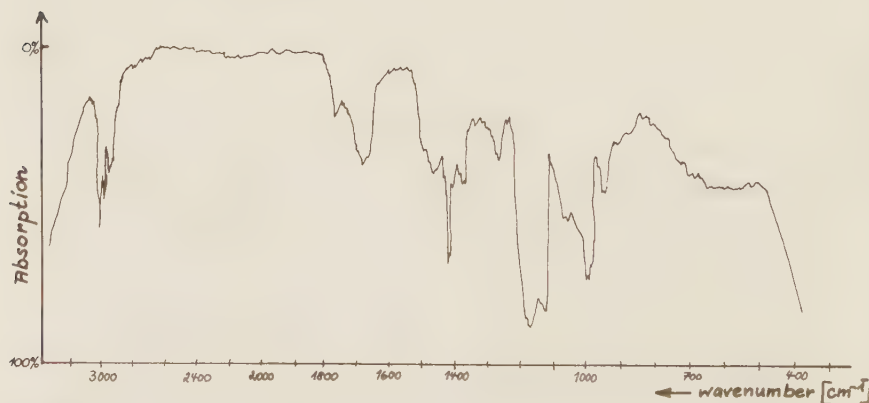


Abb. 5

Infrarotspektrum des Reaktionsproduktes zwischen CoA-SH
und Acetaldehyd

- 1) Beim Vergleich der in Abb. 4 und 5 dargestellten Kurven mit denen von früher erhaltenen Spektrogrammen von reinem Acetaldehyd bzw. Paraldehyd zeigte sich, dass in unseren chromatographisch gereinigten Präparaten diese beiden

Substanzen nicht vorhanden waren. Wir können daher annehmen, dass unsere Präparationen ausschliesslich CoA-SH bzw. das Reaktionsprodukt aus CoA-SH mit Acetaldehyd enthielten.

- 2) Die zwischen $2590 - 2540 \text{ cm}^{-1}$ zu erwartende SH-Valenzschwingung, deren Veränderung zwischen Abb. 4 und 5 einen weiteren Hinweis auf eine Reaktion an der SH-Gruppe des CoA geben könnte, ist in keinem der beiden Spektren nachweisbar. Dies ist dadurch zu erklären, dass -SH-Valenzschwingungen immer von geringer Intensität sind und hier beim CoA-Molekül durch H-Brückenbildung noch weiter vermindert sein können. Es ist somit der direkte Beweis für eine Reaktion an der SH-Gruppe durch die IR-Spektroskopie nicht zu erbringen.
- 3) Die auffallend starken Banden in Abb. 5 zwischen $2900 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{as.}}$ und $\nu_{\text{sym.}}$ -CH₃) und $1350 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ (δ_{sym} -CH₃) sind für CH-Gruppen typisch. Sie treten bei mit Acetaldehyd behandeltem CoA-SH wesentlich stärker auf als bei reinem CoA-SH und zeigen, dass an unserem Reaktionsprodukt Methylgruppen eingeführt worden sind. Da die Methylgruppen nur über den Acetaldehyd in das CoA-Molekül eingeführt worden sein können, ist zu schliessen, dass sich Acetaldehyd an das CoA-Molekül angelagert hat. Allerdings deutet die starke Intensität dieser Banden an, dass mehrere CH₃-Gruppen an das CoA angelagert worden sind. Man muss daher annehmen, dass nicht nur die SH-Gruppe des CoA, sondern noch andere Gruppen (vermutlich die NH₂-Gruppe des Adeninanteils und die alkoholischen OH-Gruppen) mit dem Acetaldehyd reagiert haben.
- 4) Es fällt auf, dass bei Abb. 5 im Vergleich zu Abb. 4 der langgezogene Abfall der OH-, NH₂-Valenzschwingung von $2800 \text{ bis } 2200 \text{ cm}^{-1}$ nicht mehr vorhanden ist. Dieser Befund deutet darauf hin, dass bei dem mit Acetaldehyd behandelten

CoA durch die Methylierung die Ausbildung intra- bzw. intermolekularer Wasserstoffbrücken ($\text{S-H}\cdots\text{N}, \text{O-H}\cdots\text{N}\cdots\text{O}$) verhindert wird. Dies hat eine Veränderung der räumlichen Struktur des CoA zur Folge.

- 5) Die stark ausgeprägte Bande bei 970 cm^{-1} (Abb. 5) kann einer -C-OH- -Schwingung zugeordnet werden. Es könnte sich hier um die -S-C-CH- -Gruppe des vermuteten Semimerkaptals handeln.



Zusammenfassend lieferte die infrarotspektrometrische Untersuchung also folgende Ergebnisse:

- 1) Das chromatographisch gewonnene Reaktionsprodukt aus CoA-SH und Acetaldehyd war rein und insbesondere frei von Acet- und Paraldehyd.
- 2) Die neugewonnene, rein dargestellte Substanz zeigte weitgehende Übereinstimmung mit dem CoA-SH, so dass die Annahme eines nur wenig abgewandelten CoA-Moleküls gerechtfertigt erscheint.
- 3) Es wurden Methylgruppen eingeführt, die nur vom Acetaldehyd herrühren können.
- 4) Es kam zu Veränderungen der räumlichen Struktur
- 5) Es liessen sich OH-Schwingungen nachweisen, die zu einem Semimerkaptal gehören könnten.

Semimerkaptale sind im Gegensatz zu Merkaptalen verhältnismässig wenig stabile Verbindungen und leicht hydrolytisch spaltbar. Um einen Anhaltspunkt dafür zu erhalten, ob unser Produkt mehr einem Semimerkaptal oder einem Merkaptal zuzurechnen sein könnte, untersuchten wir, ob diese Verbindung möglicherweise bei Verschiebung des pH-Wertes in den sauren oder alkalischen Bereich gespalten wird. Es wäre dann zu erwarten,

dass das CoA seine transacetylierenden Eigenschaften wieder-
erlangt.

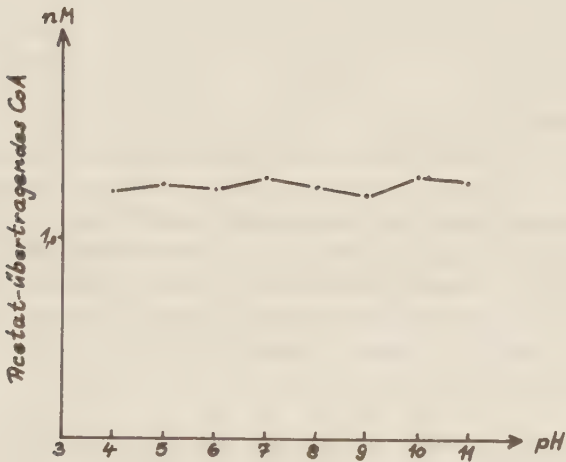


Abb. 6

Einfluss von verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen
(pH) auf die Acetat-übertragende Eigenschaft von 1,25 nmol/ml
von mit Acetaldehyd behandeltem CoA

Wie die Abb. 6 jedoch zeigt, nimmt die Uebertragung von
Acetat im biologischen Test nicht zu, wenn man das Produkt
Wasserstoffionenkonzentrationen, die einem pH zwischen 4
und 11 entsprechen, aussetzt. Die Verbindung scheint also,
was ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber saurem und alkali-
schem Milieu betrifft, verhältnismässig stabil zu sein. Diese
Eigenschaft spricht daher mehr für das Vorliegen eines Mer-
kaptals.

Auch die Ergebnisse der mit Alkohol in vivo durchgeführ-

ten Versuche lassen auf eine gewisse Stabilität schliessen. So ist die Acetat-übertragende Eigenschaft von CoA in Leber und Gehirn von Mäusen noch 10 Stunden nach i.v. Zufuhr von 4 mg/kg Alkohol signifikant um $\sim 50\%$ erniedrigt, eine Zeit, zu der kein Alkohol mehr im Blut nachweisbar ist (6).

Zusammenfassung

Ausgehend von der Beobachtung, dass bei der Maus die i.v. Verabreichung von Alkohol zur Abnahme der Acetat-übertragenden Eigenschaften des CoA in verschiedenen Organen führt, und von der Annahme, dass dafür der intermediär entstehende Acetaldehyd verantwortlich zu machen ist, wurde der Einfluss von Acetaldehyd auf die Acetat-übertragenden sowie einige chemische Eigenschaften von handelsüblichem CoA untersucht. Dabei wurden folgende Ergebnisse erhalten:

- 1) Acetaldehyd in Konzentrationen zwischen 2 und 200 $\mu\text{M}/\text{ml}$ blockiert dosisabhängig sowohl die Acetat-übertragenden Eigenschaften als auch die SH-Gruppen von 0,2 $\mu\text{M}/\text{ml}$ CoA-SH.
- 2) Die Messbarkeit von CoA im spektrophotometrischen Test wird dadurch nicht beeinflusst.
- 3) Die Blockierung der SH-Gruppen erfolgt weder durch Disulfidbildung noch durch Acylierung.
- 4) Im Infrarotspektrogramm lässt sich eine Anlagerung des Acetaldehyds an das CoA-Molekül nachweisen, jedoch ohne dass etwas über die Lokalisation gesagt werden kann.
- 5) Das biologisch inaktive Reaktionsprodukt zwischen CoA-SH und Acetaldehyd erhält auch nach Variation der Wasserstoffionenkonzentration zwischen pH 4 und 11 die Acetat-übertragende Eigenschaft des CoA nicht zurück.

Unsere Befunde legen den Schluss nahe, dass Acetaldehyd die funktionelle -SH-Gruppe in ein Semimerkaptal oder Merkaptal überführt, wodurch die Acetat-übertragenden Eigenschaften des CoA verloren gehen. Diese Ergebnisse, die an einem rein chemischen Modell gewonnen wurden, lassen jedoch wegen der benötigten hohen Acetaldehydkonzentration keinen sicheren Schluss darüber zu, ob diese Reaktion des Acetaldehyds mit CoA auch in vivo die Ursache dafür ist, dass nach Verabreichung von Alkohol die Acetat-übertragende Eigenschaft des CoA abnimmt.

Die Isolierung und Identifizierung des Semimerkaptals oder Merkaptals zwischen CoA-SH und Acetaldehyd aus tierischen Organen nach Zufuhr von Alkohol könnte endgültigen Aufschluss geben.

Literatur

- 1 Ammon, H.P.T., Estler, C.J. und Heim, F. : Der Einfluss von Aethylalkohol auf den Kohlenhydrat- und Energiestoffwechsel des Gehirns weisser Mäuse. Arch. int. Pharmacodyn. 154, 108, 1965
- 2 Heim, F., Ammon, H.P.T., Estler, C.J. und Mikschiczek, D.: Funktion und Stoffwechsel des Gehirns unter Einwirkung niedriger Alkoholkonzentrationen. Med. Pharmacol. exp. 13, 361, 1965
- 3 Ammon, H.P.T., Estler, C.J. und Heim, F.: Akute Aethanolvergiftung und Leberstoffwechsel Arch.int.Pharmacodyn. 159, 258, 1966
- 4 Ammon, H.P.T., Heim, F., Estler, C.J., Fickeis, G. and Wagner, M.: The influence of aliphatic alcohols and aldehydes and their halogen derivatives on the Coenzyme A in the liver of mice. Biochem. Pharmacol. 16, 1533, 1967
- 5 Ammon, H.P.T., Estler, C.J. and Heim, F.: Inactivation of Coenzyme A by ethanol. I. Acetaldehyde as a mediator of the inactivation of Coenzyme A following administration of ethanol. Biochem. Pharmacol. 18, 29, 1969
- 6 Ammon, H.P.T., Estler, C.J. und Heim, F.: Der Einfluss von Acetaldehyd auf Coenzym A-Aktivität und Atmung von Leber- und Hirnmitochondrien. Biochem. Pharmacol. 16, 769, 1967
- 7 Estler, C.J.: Persönliche Mitteilung
- 8 Tabor, H., Mehler, A. and Stadtmann, E.: The enzymatic acetylation of Amines J. biol. Chem. 204, 127, 1953
- 9 Grunert, R.R. and Phillips, P.H.: A modification of the nitro-prusside method of analysis for glutathione. - Arch. Biochem. 30, 217, 1951

- 10 Kaplan, N.O. and Lipmann, F.: The assay and distribution of Coenzyme A.
J. biol. Chem. 174, 37, 1948
- 11 Leuschner, F., Nachweis und Bestimmung mehrerer CoA-Verbindungen in der Leber von Meerschweinchen
Arch. exp. Path. und Pharmacol., 228, 292, 1956
- 12 Colthup, N, Daly, L , and Wiberley, S : Introduction to infra-red and Raman-Spectroscopy
Academic Press, N.Y. 1964
- 13 Kipnis, F., and Ornfelt, J.: Glyoxal hemimercaptals
J. Am. Chem. Soc. 74, 1068, 1952
- 14 Schubert, M.P.: Combination of thiol acids with methylglyoxal
J. Biol. Chem., 111, 671, 1935
- 15 Decker, K.: Die aktivierte Essigsäure, F. Enke Verlag, Stuttgart, 58, 1959

LEBENS LAUF

Volker F. Lachmann

Geboren am: 21. Dezember 1942 in Haynau (Schlesien)
Vater: Waldemar Lachmann, Bankleiter
Mutter: Martha Lachmann, geb. Köhler

Schulen

Grundschule in Leonberg-Eltingen 1949 - 1953
Gymnasium in Korntal bei Stuttgart 1953 - 1962
(Abschluss: Abitur)

Praktikum

Apothekerpraktikant in der Löwen-Apotheke
in Sindelfingen 1962 - 1964

Studien

Studium der Pharmazie an der Universität
Erlangen 1964 - 1967

Pharm. Staatsexamen 13. August 1967

Beginn des Studiums der Medizin Winter 1965/66
Physikum 11. August 1968
Ein Fachsemester an der Universität
in Rennes/Frankreich WS 1968/1969
Med. Studium in Erlangen 1969 - 1972

Medizinisches Staatsexamen 9. Februar 1972

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990